

doi: 10.12452/j.fxcxsb.250409275

基于核酸分子光开关的可视化重组酶聚合酶扩增检测方法

邓帆¹, 孙娜娜¹, 周凯乐¹, 刘江花¹, 李国梁¹, 徐秦峰^{1*}, 冯霞²

(1. 陕西科技大学 食品科学与工程学院, 国家羊乳制品加工技术研发专业中心, 陕西 西安 710021; 2. 山西省实验中学, 山西 太原 030032)

摘要: 该研究将核酸分子“光开关” $[Ru(bpy)_2(dppz)]^{2+}$ 作为荧光染料应用于实时荧光RPA扩增, 实现了对食源性致病菌(如金黄色葡萄球菌(*S. aur*)和沙门氏菌(*S. spp*))的单重和多重实时荧光RPA扩增检测。此外, 基于 $[Ru(bpy)_2(dppz)]^{2+}$ 建立了一种快速、可视化RPA检测方法, 该方法通过直接观察扩增产物DNA与 $[Ru(bpy)_2(dppz)]^{2+}$ 结合后在可见光下产生的强烈红色荧光信号判定扩增结果, 避免了高浓度 $[Ru(bpy)_2(dppz)]^{2+}$ 对扩增反应产生的明显抑制, 有良好的可视化检测效果, 具有高特异性和高灵敏度, 有望广泛应用于环境监测、食品安全和临床诊断的现场快速核酸检测。

关键词: 重组酶聚合酶扩增(RPA); $[Ru(bpy)_2(dppz)]^{2+}$; 可视化检测; 金黄色葡萄球菌

中图分类号: O657.3; O629.74 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2026)01-0184-06

A Visualized Detection Method for Recombinase Polymerase Amplification Based on Nucleic Acid Molecular Light Switch

DENG Fan¹, SUN Na-na¹, ZHOU Kai-yue¹, LIU Jiang-hua¹, LI Guo-liang¹,
XU Qin-feng^{1*}, FENG Xia²

(1. National R&D Center for Goat Dairy Products Processing Technology, School of Food Science and Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, China; 2. Shanxi Experimental Secondary School, Taiyuan 030032, China)

Abstract: Compared with polymerase chain reaction (PCR) and loop-mediated isothermal amplification (LAMP), recombinase polymerase amplification (RPA) has a shorter reaction time (5–20 min) and requires less temperature and equipment, and can be carried out at 37–42 °C. However, the current organic dyes used for real-time fluorescent RPA are dependent on imports and have small Stoke shifts, which are not conducive to visualization and observation. In this study, we applied the nucleic acid molecule “light switch” $[Ru(bpy)_2(dppz)]^{2+}$ as a fluorescent dye for real-time fluorescent RPA amplification, and realized single and multiple real-time fluorescent RPA amplification detection of food-borne pathogens (e. g., *Staphylococcus aureus* (*S. aur*), and *Salmonella* (*S. spp*)). In addition, a rapid and visualized RPA detection method was established based on $[Ru(bpy)_2(dppz)]^{2+}$, which determines the amplification results by directly observing the strong red fluorescence signal generated under visible light after the binding of amplification product DNA to $[Ru(bpy)_2(dppz)]^{2+}$, avoiding the obvious inhibition of the amplification reaction caused by high concentration of $[Ru(bpy)_2(dppz)]^{2+}$, and has good visualization effect. It avoids the obvious inhibition of the amplification reaction caused by high concentration of $[Ru(bpy)_2(dppz)]^{2+}$, and has good visualization detection effect, high specificity and high sensitivity, and is expected to be widely used in the field of rapid nucleic acid detection for environmental monitoring, food safety and clinical diagnosis.

Key words: recombinase polymerase amplification (RPA); $[Ru(bpy)_2(dppz)]^{2+}$; visualization assay; *S. aureus*

核酸作为生物体的遗传物质, 一直是生物化学研究的热点, 随着分子生物学的不断发展, 体外核

收稿日期: 2025-04-09; 修回日期: 2025-05-15

基金项目: 国家自然科学基金(22074085); 十四五“国家重点研发计划”(2023YFF1104701); 陕西省科技厅项目(2023GXLH-078)

* 通讯作者: 徐秦峰, 博士, 教授, 研究方向: 食品质量与安全检测, E-mail: xuqinfeng@sust.edu.cn

网络首发日期: 2025-11-07

酸扩增技术已经实现并且日趋完善, 对于食品安全、环境监测、农业生产、疾病诊断等方面的发展具有重要意义。聚合酶链式反应(PCR)作为最早被应用的体外扩增技术, 已经成为分子生物学检测的重要手段, 但PCR技术检测周期长、步骤繁琐, 难以实现即时快速的检测, 只能在实验室或特定设备存在的条件下, 依赖于价格高昂的精密仪器, 不利于基层现场快速检测的开展^[1-2]。

等温核酸扩增技术凭借其强特异性、高灵敏度、简便快捷和低成本等优点逐渐受到了广泛关注。其中以环介导等温扩增技术(LAMP)、重组酶聚合酶扩增技术(RPA)和重组酶介导等温扩增技术(RAA)最具代表性。与LAMP、RAA不同, RPA可以非常快速(5~20 min)地扩增DNA/RNA, 并且可以在接近体温的温度(37~42 °C)下实现指数扩增, 故而极大地推进了这类等温核酸扩增技术基层现场快速检测应用的实现^[3-5]。

RPA技术在2006年基于参与细胞DNA合成、重组和修复的蛋白质完成开发^[6], 相比于PCR具有操作简单、扩增速度快、反应温度低等优点, 已经广泛应用于细菌、病毒、真菌等检测领域^[7]。在RPA反应中, 重组酶蛋白在三磷酸腺苷(ATP)存在下与引物结合, 形成重组酶-引物复合物。重组酶-引物复合物会寻找DNA模板中的同源序列, 并促进引物在同源位点的链侵袭, 形成D环结构, 由单链结合蛋白稳定。最后, 重组酶自发分解, Bsu聚合酶与引物的3'端结合, 在脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)存在下将其延伸, 形成新的互补链^[6-8]。循环重复此过程可实现对靶基因的指数扩增。

目前RPA一般通过终点检测(扩增后)对扩增子进行分析, 其中大多数采用的是侧向层析检测, 当然, 常规的琼脂糖凝胶电泳、比色检测、荧光检测都可以作为RPA的终点检测方法^[6,9-10]。但由于RPA扩增体系中存在多种酶组分, 直接电泳时对电泳条带存在干扰, 因此需对RPA产物进行纯化, 导致实验操作和检测时间增加, 降低了检测效率^[11]。鉴于此, 一些实时监测的方法被开发出来, 目前主要为探针法和染料法。Exo和Fpg探针^[12]已被研究用于实时的RPA检测, 具有极高的特异性, 但成本昂贵。染料法是将荧光染料嵌合在DNA双链结构中的方法, 随着扩增子的增加, 荧光信号逐渐增强, 该法具有成本低、可实现多重检测的优势。目前SYBR Green I^[13]、Eva Green^[14]等商业染料已被应用, Piepenburg等^[13]将SYBR Green I用于实时荧光RPA, 通过收集扩增期间的荧光信号实现了对枯草芽孢杆菌SpoB基因的实时测定。Loo等^[14]将Eva Green与实时RPA结合, 在37 °C下通过对信号的实时收集完成了对细胞色素-c的检测。同时, 这些荧光染料也被用于RPA的终点检测, 实现了对小肠结肠炎耶尔森菌^[15]、*H. contortus*^[16]的检测以及GTS 40-3-2大豆^[17]的筛选。但是这些染料依赖进口, 且Stoke's位移小, 不利于可视化观察。

金属钌配合物例如 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ 是一种核酸分子光开关, 在水溶液中几乎不发光, 当出现双链DNA时则会嵌入双螺旋结构, 从而恢复荧光。与商品化染料相比, $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ 具有Stoke's位移大、结构稳定、易于合成、价格低廉的优点^[18-20], 可作为核酸检测的新型染料。本课题组前期研究表明, $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ 可作为荧光染料对PCR、LAMP反应进行实时监测, 并将其应用于LAMP的快速可视化检测^[21-25], 且其明确的结构更有利于后续的实验优化。但是目前尚未有 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ 用于实时荧光RPA检测的相关报道。

本研究采用金属钌配合物 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ 作为荧光染料, 将其应用于实时荧光RPA的单重及多重扩增检测, 基于 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ 的发光特性观察反应结束后体系的荧光信号, 进而判定扩增结果, 达到可视化检测的目的。PCR、LAMP反应由于体系中高浓度 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ 引起的强烈抑制, 导致其可视化检测需要进行较为繁琐的管内物理分隔操作, 而RPA反应在较高浓度 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ 存在下不会产生明显抑制作用, 反应后得到的扩增产物依旧可以在蓝光透射仪下观察到强烈的红色荧光信号。基于此实现了对常见食源性致病菌(如金黄色葡萄球菌(*S. aur*)、沙门氏菌(*S. spp*))DNA模型分析物的快速、可视化荧光检测。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

高速冷冻离心机(安徽方领生物医疗设备有限公司); 移液枪(Eppendorf AG公司); 移液枪枪头(Axygen Scientific公司); 分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); 全自动高通量毛细管凝胶电泳

仪器(Qsep1)(台湾光鼎Bioptic公司); B-BOX 蓝光透射仪(Smobio Technology公司); 超微量分光光度计(Thermo Scientific公司); 生物洁净型标准洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); MyGo 实时荧光定量 PCR 系统(英国 IT-IS Life Science Ltd公司); 琼脂糖水平电泳仪(Bio-Rad Laboratories公司)。

TwistAmp®Basic 试剂盒(TwistDx公司); $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ (Jena Bioscience公司); 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、普通 DNA 产物纯化试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司); 琼脂糖(Thermo Fisher Scientific)。

1.2 RPA引物设计

选取金黄色葡萄球菌(*S. aur*)fem 基因保守序列和沙门氏菌(*S. spp*)的 Stn 基因保守序列, 通过比对基因序列并依据引物设计原则^[10], 采用 DNA Man 设计用于扩增 fem 基因、Stn 基因的特异性引物, 并经过 BLAST 比对验证其对 *S. aur*、*S. spp* 的特异性, 所得引物序列如表 1 所示。

表 1 实验所用引物序列
Table 1 Sequence of primers used in the experiment

Name	Sequence(5'-3')	Amplification target fragment size/bp
<i>S. aur</i> -F3	TTTAACAGCTAAAGAGTTTGGT	231
<i>S. aur</i> -B3	TTTTCATAATCRATCACTGGAC	
<i>S. spp</i> -F3	CCTTTCGGCTATCGGTAAC	210
<i>S. spp</i> -B3	GGATGCCCAAAGCAGAGAG	

设计好的引物由上海生工生物工程有限公司合成并经过 HPLC 纯化。引物开盖前经 5 000 r/min 离心 1 min 使其沉在底部, 防止开管粉末挥洒, 开管后按照其管上标注的 OD 值加入相应的 1× TE Buffer, 稀释至 100 μmol/L, 充分振荡混匀, 分装后于 -20 °C 保存备用。

1.3 金黄色葡萄球菌和沙门氏菌 DNA 提取

无菌操作下将 *S. aur* 以及 *S. spp* 接种于 LB 培养基增菌培养, 之后使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒对菌体 DNA 进行提取, 获得 *S. aur*、*S. spp* 的 DNA, 使用超微量分光光度计对提取获得的 DNA 的浓度及纯度进行测定后分装放置在 -20 °C 保存备用。

1.4 RPA 实时荧光检测

1.4.1 实时荧光单重检测 无菌操作下进行 RPA 扩增反应体系的配制, 采用 10 μL 反应体系进行扩增: RPA 反应缓冲液(5.9 μL)、*S. aur* 上游引物 F3(0.48 μL, 10 μmol/L)、*S. aur* 下游引物 B3(0.48 μL, 10 μmol/L)、MgOAc(0.5 μL, 280 mmol/L)、*S. aur* DNA 模板(1 μL)、 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ (1 μL, 30 μmol/L), 同时设置无模板阴性对照并用双蒸水补齐剩余体积。

RPA 扩增在 MyGo 实时荧光 PCR 仪中进行, 反应程序选择 37 °C、15 min; 反应中检测荧光信号, 检测通道选择 ROX 光通道。

将 10^{10} copies/μL 的 *S. aur* DNA 或 *S. spp* DNA 原液 10 倍梯度稀释为 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 copies/μL, 并以水作为空白对照, 分别进行实时荧光 RPA 的扩增反应, 获得扩增产物后进行熔解分析; 结合各扩增反应扩增曲线对应的阈值时间绘制标准曲线。

1.4.2 实时荧光多重检测 在配制反应体系时同时加入针对 *S. aur* 和 *S. spp* 的两对引物, 分别以 *S. aur* DNA、*S. spp* DNA 以及 *S. aur* DNA 与 *S. spp* DNA 为模板, 同时设置无模板的空白对照共 4 组样品。反应体系混匀后进行实时荧光 RPA 扩增, 同时采用毛细管电泳对扩增产物进行分析。

1.5 基于 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ 的 RPA 目视比色检测

反应体系配制时, 分别设置含 *S. aur* DNA 的 3 组样品, 其中依次含终浓度为 1、3、5 μmol/L 的 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$, 同时设置含有相应终浓度 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ 的 3 组无模板空白对照样品。反应体系混匀后进行实时荧光 RPA 扩增, 同时采用毛细管电泳对扩增产物进行分析。

1.6 模拟实际样品检测

在反应体系配制时, 分别设置 *S. aur* 阳性实验组, 混合牛乳样品的 *S. aur* 实验组, 加入 3 μmol/L 的 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$; 并设置相应无模板阴性空白对照, 反应体系混匀后进行实时荧光 RPA 扩增。同时配制相同的实验组及空白对照, 反应体系混匀后进行 PCR 扩增, 作为标准方法^[26]进行比对, 采用 2% 琼脂糖凝胶对扩增结果进行分析, 电泳条件为 100 V, 电泳时间 35 min。

2 结果与讨论

2.1 基于 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ 的RPA实时荧光单重检测可行性

$[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ 的结构如图1A所示, 当环境中存在DNA时, dppz配体会插入双链结构中使荧光得以恢复。当RPA扩增开始后, 反应生成大量DNA双链与染料结合, 含模板的阳性样品荧光信号随着时间延长而增强, 无模板的空白阴性对照荧光信号强度则无明显变化。扩增结束后以反应时间为横坐标、荧光强度为纵坐标, 绘制实时扩增曲线(图1B), 将扩增产物以 $0.05\text{ }^\circ\text{C}/\text{s}$ 的熔解速率进行熔解并实时检测荧光信号, 阳性对照具有特异的熔解峰, 而阴性对照则无熔解峰(图1C)。以上结果表明, 在RPA扩增反应结束后可以根据熔解峰的有无判断待测样品中是否存在扩增的靶标核酸, 即 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ 作为荧光染料应用于实时荧光RPA扩增可行。

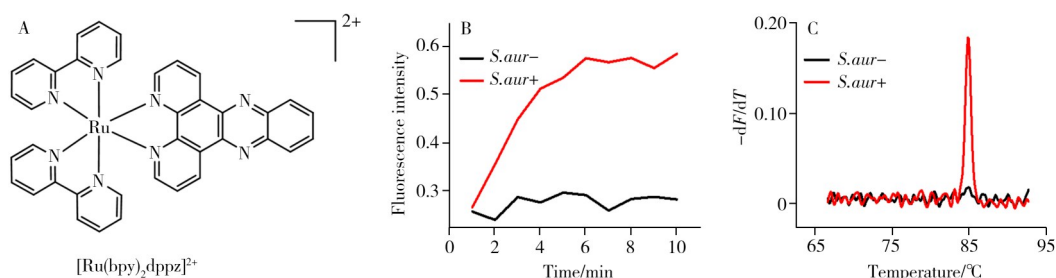


图1 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ 的结构(A)、实时荧光RPA扩增曲线(B)及实时荧光RPA熔解曲线(C)

Fig. 1 Structure of $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ (A), real-time fluorescent RPA amplification curves(B) and real-time fluorescent RPA melting curves(C)

在以不同浓度的 *S. aur* DNA 作为模板进行实时荧光 RPA 扩增反应后, 采用各浓度模板下所得扩增曲线对应的阈值时间绘制标准曲线(图2)。结果表明, 在以 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ 构建的实时荧光 RPA 检测方法中, 扩增产物的模板浓度与阈值时间呈现出良好的线性相关性($r^2 = 0.9969$), 因此该方法可用于定量检测。

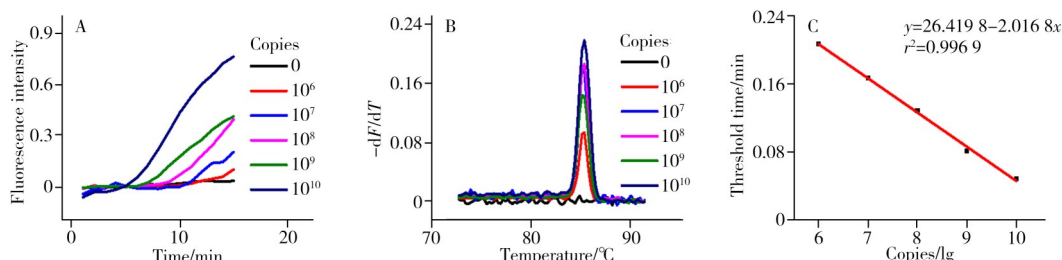


图2 基于 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ 的*S. aur*实时荧光RPA检测

Fig. 2 Real-time fluorescent RPA assay for *S. aur* based on $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$

A. real-time fluorescent RPA amplification curves, B. melting curves at different template concentrations, C. linearity of *S. aur* template concentration versus threshold time

2.2 基于 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ 的RPA实时荧光多重检测

为研究基于 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ 的RPA多重检测效果, 对 *S. aur*、*S. spp* 以及 *S. aur* 与 *S. spp* 的3组DNA样品进行了实时荧光扩增(图3)。对于含单一DNA模板的扩增产物, *S. aur* DNA的熔解峰位置在 $85\text{ }^\circ\text{C}$, *S. spp* DNA在 $90\text{ }^\circ\text{C}$; 对于同时含 *S. aur* 与 *S. spp* 两种DNA的扩增产物, 其分别在 $85\text{ }^\circ\text{C}$ 和 $90\text{ }^\circ\text{C}$ 处出现相应的熔解峰(图3B), 这些熔解分析结果与毛细管凝胶电泳结果一致(图3C)。以上结果表明, 基于 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ 建立的多重实时荧光RPA检测方法, 可实现待测样品中不同来源的靶标核酸序列的同时扩增, 且根据熔解温度差异可实现对扩增产物的特异性判定。

2.3 RPA闭管目视比色检测

含不同浓度(1、3、5 $\mu\text{mol}/\text{L}$) $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ 的3组阳性样品, 其反应体系均可实现扩增(图4A), 经熔解分析后得到特异性扩增产物的熔解峰(图4B), 且反应结束后进行毛细管凝胶电泳也获得了明显的扩增产物条带(图4C)。RPA扩增反应结束后, 使用蓝光透射仪观察3组加入不同浓度 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ 的

阳性样品, 其所在反应管中均显示红色, 而 3 组无模板的空白对照样品尽管也加有 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$, 但在 RPA 扩增反应结束后, 相应反应管中均无颜色显现(图 4D)。以上结果表明, 应用 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ 作为荧光染料可以实现 RPA 闭管目视比色分析, 且对检测设备要求更低, 可用其他任何能够提供等温扩增反应条件的设备(如恒温水浴)替换实时荧光 PCR 仪。

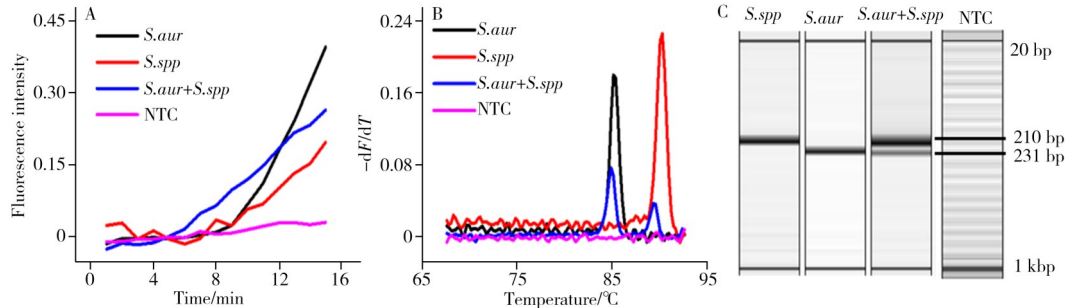


图 3 基于 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ 的多重实时荧光 RPA 检测

Fig. 3 Multiplexed real-time fluorescent RPA assay based on $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$

A. amplification curves, B. melting curves, C. capillary electrophoresis results of real-time fluorescent RPA amplification products; NTC means no template negative

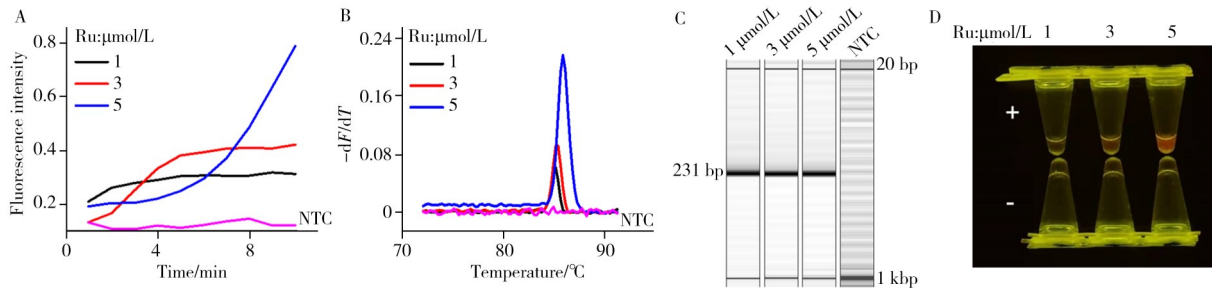


图 4 不同 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ 浓度下的 RPA 闭管目视比色检测

Fig. 4 RPA closed-tube visual colorimetric assay at different concentrations of $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$

A. amplification curves, B. melting curves, C. capillary electrophoresis results of real-time fluorescent RPA amplification products, D. RPA closed-tube visual colorimetric results; NTC denotes no template negative, "+" indicates positive sample

2.4 模拟实际样品检测

为验证方法的实用性, 对人工 *S. aur* 污染的牛乳样品进行了检测。同时与 PCR 标准方法进行比对。如图 5 所示, 在牛奶复杂样品中可以实现对 *S. aur* 的扩增检测(图 5A), 经熔解分析后得到特异性扩增产物的熔解峰(图 5B), 结果与 PCR 方法检测结果一致(图 5C)。表明 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ 作为荧光染料在实际样品检测中具有一定的实用性且检测结果可靠。

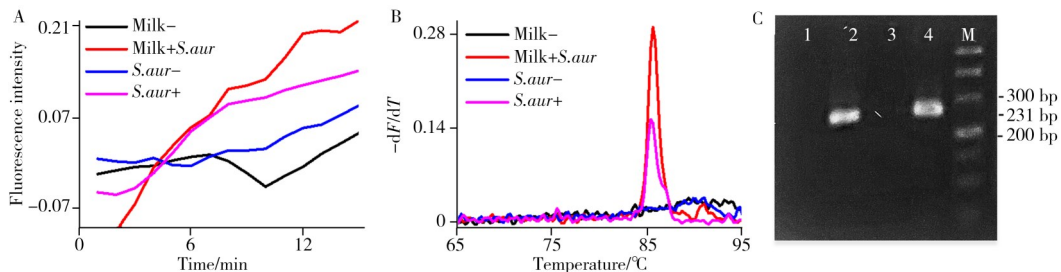


图 5 牛乳实际样品检测的 RPA 扩增曲线(A)、熔解曲线(B)及牛乳实际样品检测的 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果(C)

Fig. 5 RPA amplification curves(A) and melting curves(B) for the detection of milk; results of agarose gel electrophoresis of PCR amplification products from actual samples of milk(C)

lanes 1-4 indicate milk samples without *S. aur*, milk samples with *S. aur*, *S. aur* negative, *S. aur* positive, respectively; lane M: DNA marker

3 结论

本文探究了明确结构的 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ 代替商业染料(如 SYBR Green I、Eva Green)用于 RPA 实时荧光扩增的可行性, 实现了食源性致病菌的单重及多重检测, 并将 RPA 与 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ 相结合, 建

立了基于 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ 的闭管可视化RPA检测方法。通过对染料浓度的优化,在蓝光透射仪下观察到了明显的红色荧光发光,进而判定扩增结果。整个检测过程可以在较低温度(37~42℃)下于短时间内(5~20 min)完成,对设备及环境的依赖度较低,并获得了较高的灵敏度。该法具有可视化检测对比效果明显、特异性好以及简单快速等优势,可应用于环境检测、食品安全、临床诊断等领域的现场快速核酸检测。

参考文献:

- [1] Shen F Y, Ge X, Zhang X Y, Zhang Y B, Zhou H Z, Li H. *Microbiol. China*(沈方园, 葛萧, 张晓宇, 张郁勃, 周慧姿, 李恒. 微生物学通报), **2024**, 51(5): 1495-1511.
- [2] Haddon C, Fan X X, Zhao Y G, Wang S J, Zhang Z C, Ge S Q, Li L, Wu X D, Wang Z L. *China Anim. Husb. Vet. Med.* (哈登楚日亚, 樊晓旭, 赵永刚, 王淑娟, 张志诚, 戈胜强, 李林, 吴晓东, 王志亮. 中国畜牧兽医), **2017**, 44(11): 3270-3277.
- [3] Guan Z W, Qi L J, Zhang Y, Zhang X J, Guo Z J, Du Y. *Chin. J. Anal. Chem.* (管昭巍, 齐丽娟, 张玉, 张晓军, 郭志军, 杜衍. 分析化学), **2023**, 51(7): 1077-1085.
- [4] Fan X X, Haddon C, Wang L Y, Wang J, Liu C J, Chi T Y, Zhao Y G, Zhang Z C, Wu X D, Wang Z L. *Chin. J. Anim. Quar.* (樊晓旭, 哈登楚日亚, 王英丽, 王姣, 刘春菊, 迟田英, 赵永刚, 张志诚, 吴晓东, 王志亮. 中国动物检疫), **2017**, 34(8): 81-86.
- [5] Mao Y X, Liu M D, Zhang H B, Qu Y, Nan W L, Su H B, Liu J Z, Sun S F, Hu L P, Fan X X. *Chin. J. Anim. Quar.* (毛迎雪, 刘蒙达, 张皓博, 曲瑶, 南文龙, 苏华彬, 刘建柱, 孙淑芳, 胡莉萍, 樊晓旭. 中国动物检疫), **2024**, 41(1): 60-66.
- [6] Lobato I M, O'Sullivan C K. *Trends Anal. Chem.*, **2018**, 98: 19-35.
- [7] Tan M Y, Liao C, Liang L, Yi X L, Zhou Z H, Wei G J. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **2022**, 12: 1019071.
- [8] Munawar M A. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, **2022**, 22(7): 725-737.
- [9] Lei Q. *Establishment and Application of a Dual RT-RPA Assay for Foot-and-mouth Disease Virus and Senecaviruses*. Handan: Hebei University of Engineering(雷乾. 口蹄疫病毒和塞内卡病毒双重RT-RPA检测方法的建立及应用. 邯郸: 河北工程大学), **2022**.
- [10] Liu Y X. *Application of Real-time PCR and RPA Technology to Detect the Overwintering Source of Wheat Stripe Rust in Qinghai Province*. Xining: Qinghai University(刘耀霞. 应用Real-time PCR和RPA技术检测青海省小麦条锈菌越冬菌源. 西宁: 青海大学), **2022**.
- [11] Li J, Macdonald J, Von Stetten F. *Analyst*, **2019**, 144(1): 31-67.
- [12] Daher R K, Stewart G, Boissinot M, Bergeron G M. *Clin. Chem.*, **2016**, 62(7): 947-958.
- [13] Piepenburg O, Williams C H, Stemple D L, Armes N A. *PLoS Biol.*, **2006**, 4(7): e204.
- [14] Loo J, Lau P M, Ho H P, Kong S K. *Talanta*, **2013**, 115: 159-165.
- [15] Zheng Y, Hu P, Ren H L, Wang H, Cao Q, Zhao Q, Li H X, Zhang H L, Liu Z X, Li Y S, Wang C, Liu Z S, Lu S Y. *Anal. Biochem.*, **2021**, 621: 114157.
- [16] Khangembam R, Vass N, Morrison A, Melville L, Antonopoulos A, Czeplédi L. *Vet. Parasitol.*, **2023**, 320: 109974.
- [17] Wang R, Zhang F, Wang L, Qian W J, Qian C, Wu J, Ying Y B. *Anal. Chem.*, **2017**, 89(8): 4413-4418.
- [18] Chen B B, Xiao G Y, He M, Hu B. *Anal. Chem.*, **2021**, 93(27): 9454-9461.
- [19] Zhang C C, Hu Q, Wu S, Chen F. *Talanta*, **2020**, 217: 121103.
- [20] Li G Y, Zou S S, Chao H, Ji L N. *Sci. Sin.: Chim.* (李观营, 邹珊珊, 巢晖, 计亮年. 中国科学: 化学), **2014**, 44(4): 448-459.
- [21] Xu Q F, Dong J, Ma X Y, Li C C, Zhang C Y. *Anal. Chem.*, **2019**, 91(14): 8777-8782.
- [22] Wang F, Dong J, Li Y N, Xu Q F. *J. Instrum. Anal.* (王芳, 董菁, 李艳妮, 徐秦峰. 分析测试学报), **2022**, 41(4): 646-651.
- [23] Xu Q F, Dong J, Song H X, Liu J L. U. S. Patent, CNCN2019/092406.[2019-12-26].
- [24] Shaanxi University of Science and Technology, China Patent(陕西科技大学. 中国专利), ZL201810653529.1.[2021-07-23].
- [25] Shaanxi University of Science and Technology, China Patent(陕西科技大学. 中国专利), ZL201810930735.2.[2018-12-18].
- [26] SN/T 1869-2007. Rapid Detection Methods for Pathogens in Foods-PCR Method. Import and Export Industry Standards of the People's Republic of China(食品中多种致病菌快速检测方法PCR法. 中华人民共和国进出口行业标准).

(责任编辑: 盛文彦)